

院内肺炎

とものかずのり
朝野和典

大阪大学医学部附属病院 感染制御部

POINT

- 院内肺炎は、市中肺炎に比べ薬剤耐性菌の頻度が高く、予後が不良である。
- 抗菌薬の選択は初期には広域の抗菌薬をエンピリックに選択しても、3～4日目に臨床症状と細菌学的検査結果をもとに、de-escalationを行うことを検討する。
- 治療期間は7～10日間である。

ガイドラインの現況

わが国の肺炎のガイドラインの代表的なものは日本呼吸器学会から出されている。そのうち院内肺炎に関するガイドラインは、2002年に初版『成人院内肺炎診療の基本的考え方』¹⁾が出版され、その後、2008年に改訂版『成人院内肺炎診療ガイドライン』²⁾が出された。

2011年には、それまで院内肺炎の一部とされていた長期療養型病床に入院中の患者の肺炎を含んだ『医療・介護関連肺炎（NHCAP）診療ガイドライン』³⁾が出され、院内肺炎に含まれる患者のクライテリアが変わった。

以上の変遷の中で、日本呼吸器学会の現在の院内肺炎の対象は、入院患者から療養病床および精神病床入院中の患者を除いた一般病床に入院中の患者が対象となる。療養病床に入院中の患者に発症した肺炎はNHCAP（nursing and healthcare associated pneumonia）の対象となる（図1）。

【本稿のバックグラウンド】 院内肺炎の対象となる患者は、医療介護関連肺炎（NHCAP）が新たに設定されたため、クライテリアが変更されている。新しいクライテリアでは、従来の院内肺炎の対象患者から、療養型病床および精神病床に入院中の患者を除外した、一般病床に入院中の急性期疾患を中心とする患者群が対象となる。

どういう疾患・病態か

院内肺炎とは、一般病床に入院中の肺炎以外の疾患で治療中あるいは診断中の患者に発症した肺炎である。入院前にすでにその人に感染している微生物によって、入院後に肺炎

を発症する場合もあり、その場合は市中肺炎とよぶべきである。そこで、潜伏期を考慮して、入院48時間（あるいは72時間）以降に発症した肺炎を院内肺炎と定義する。

院内肺炎は、さまざまな医療行為を受けている患者に発症するために、病院環境にいる

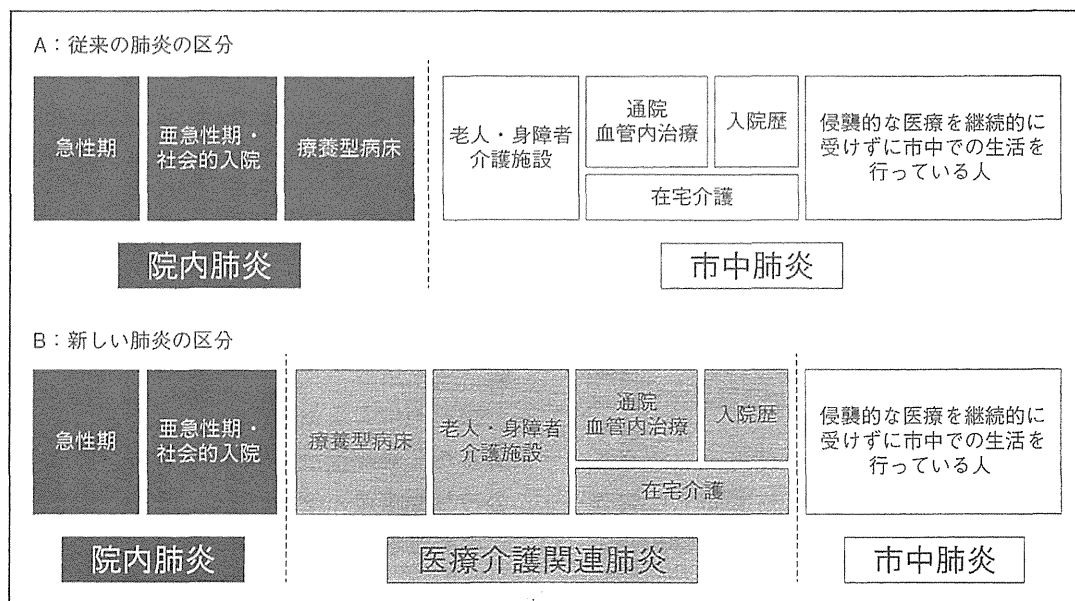


図1 日本呼吸器学会の肺炎の分類の新旧対照（精神病床を除く）

（文献3を参照して作成）

薬剤耐性菌が職員の手指，器具を介して院内感染として伝播したり，抗菌薬の投与を受けることで体内にいる薬剤耐性菌が選択されたりして発症する。そのため，薬剤耐性菌によって発症する確率が，市中にいる患者より高く，かつ基礎となる併存疾患があるために，予後も不良となる。

治療に必要な検査と診断

表1に院内肺炎の分離菌の種類と頻度を示す。これらの細菌が必ずしも原因菌であるというわけではなく，気道に定着しているだけの菌も含まれる。肺炎の原因菌を決定することは困難である。

肺炎の診断は画像，症状等で行うが，細菌学的な検査は診断や治療薬の選択においてきわめて重要であるが，いまだに多くの問題が残されている。肺炎は肺胞領域で起こる炎症であるが，多くの場合，細菌学的な検査の検体となる喀痰は，肺胞，気道，口腔のいずれ

表1 院内肺炎発症患者からの分離菌

菌種	院内肺炎患者分離菌 (812株)
黄色ブドウ球菌	25.6%
緑膿菌	18.1%
クレブシエラ属	8.3%
エンテロバクター属	2.1%
ステロトロフォモナス	1.6%
セラチア属	3.0%
インフルエンザ菌	3.6%
肺炎球菌	5.0%
アシネトバクター属	0.7%
大腸菌	2.7%
他の連鎖球菌	6.7%

（文献2より引用）

の部位から由来するのか不明である。喀痰の品質分類である Geckler 分類も，炎症と唾液の混入の有無は鑑別できても，気道由来であるのか，肺胞由来であるのかの鑑別はできない。そのため，気道の定着菌と肺炎の原因菌

との鑑別はできない。

肺炎の原因菌の同定には、喀出痰では不十分であり、感染病巣局所から、気管支鏡を用いて、気管支肺胞洗浄（bronchoalveolar lavage：BAL）法や被覆した検体採取用ブラシ（protected specimen brush：PSB）による採痰などの侵襲的検査方法で採取された下気道由来痰が必要である。そのような検体を、さらに検査室で定量培養することで決定できるとされている⁴⁾。

日本呼吸器学会の『成人院内肺炎診療ガイドライン』²⁾では、良質な喀痰もしくは気管内吸引痰には原因微生物が含まれているという前提で、そこに含まれていない細菌は原因微生物ではないと判断し、初期に開始した抗菌薬のエンピリック治療を de-escalation することを勧めている。de-escalation とは、

細菌学的な検査結果と臨床経過から原因微生物を推定あるいは否定し、投与中の抗菌薬を中止したり変更したりしてより狭域の抗菌薬に変更することである。肺炎の原因微生物の診断には、血液培養、肺炎球菌やレジオネラの尿中抗原の検出も重要な検査材料となる。

治療の実際

抗菌薬による治療が、感染症の病因治療であるが、対症療法として、水分の補給、酸素の投与や喀痰のドレナージなども必要に応じて行う重要な治療である。

抗菌薬の選択にあたっては、患者の年齢、腎機能、肝機能などの基礎状態の把握が必要である。特に腎機能障害のある場合には、選択する抗菌薬が限定されたり、あるいは投

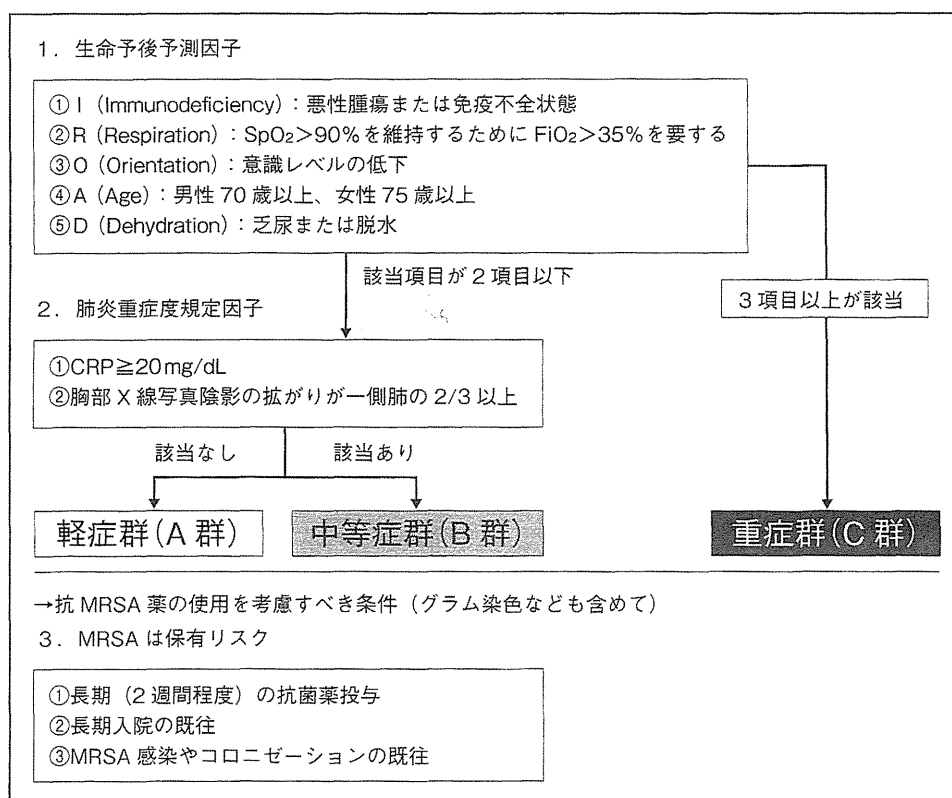


図 2 院内肺炎重症度分類

(文献 3 より引用)

与量の調節が必要となったりする。

初期抗菌薬の選択は、エンピリック治療となる。エンピリック治療を行う場合、それまでの細菌の培養結果、抗菌薬の投与履歴などを考慮して、耐性菌の危険因子の有無を判断する。

日本呼吸器学会の『成人院内肺炎診療ガイドライン』²⁾では、重症度に応じた抗菌薬選択を示している。同ガイドラインの重症度分類を示す(図2)。

また同ガイドラインの検証が報告されている。その結果、30日後の死亡率を指標とした予後は群別によく相関し、A群12%、B群25%、C群40%であり、重症度分類とよく相関していた⁵⁾。

耐性菌の因子に関する検討では、A群においては耐性菌の有無にかかわらず予後は変わらず、B群以降は耐性菌の分離された症例は耐性菌の分離されなかった症例に比べて予後が不良であった、とされている。

そのため、A群の患者に対しては、市中肺炎の原因菌である肺炎球菌やインフルエンザ菌を中心とする細菌を対象とした抗菌薬選択を推奨している。B群、C群の患者に対しては、緑膿菌をはじめとするグラム陰性ブドウ糖非発酵菌を含む耐性菌を対象とした抗菌薬選択を推奨している。MRSAはすべての患者に対して、原因菌と考えられる場合には抗MRSA薬の選択が行われる。

抗菌薬治療の期間の目安は、およそ7~10日間であり、それ以上同じ抗菌薬を使用すると、耐性菌の頻度が増加するといわれている。

抗菌薬の投与方法、投与量の決定には、抗菌薬の薬剤特性への理解が必要である。抗菌薬の臨床効果を薬物の薬物動態学(pharmacokinetics: PK)と薬理学(pharmacodynamics: PD)をもとに検討し、投与量、投与方法を決定する²⁾。

処方例

原因微生物が推定できない時点での初期治療の例である。原因菌が判明したら、より適正な抗菌薬に変更する。治療期間は7~10日間が標準である。

軽症例

処方A ロセフィン静注用1g 1本(1g)
1日2回

処方B ユナシン-S静注用3g 1本
(3g) 1日3回

中等症例

処方A チエナム筋注用0.5g 1本
(0.5g) 1日2~4回

処方B ゾシン静注用4.5g 1本(4.5g)
1日3~4回

重症例(集中治療室管理)

処方 メロペン点滴用バイアル0.5g 2
本(計1g) 1日3回+シプロフロ
キサシン点滴静注300mg 1本
(300mg) 1日2回

※ただし、MRSAが疑われるときには、バンコマイシンもしくはリネゾリドを上記に併用する。

専門医に紹介するタイミング

重症敗血症(severe sepsis)、敗血症性ショック(septic shock)を併発しているとき、人工呼吸器管理が必要な場合などは、感染症医あるいは集中治療医にコンサルトしながら治療を行う。また喀痰などから薬剤耐性菌が分離されているような場合には、定着菌なのか真の原因菌なのかの判断が難しいため専門

医にコンサルトする。

専門医からのワンポイントアドバイス

院内肺炎は、市中肺炎に比べ薬剤耐性菌が多く、予後も不良なことから、カルバペネム系抗菌薬などの広域抗菌薬を初期から選択することが多くなる。しかし、広域抗菌薬を選択した場合、その時点での肺炎は治癒したとしても、その後に肺炎などの感染症を発症すれば、より薬剤に耐性の細菌による感染症となる可能性が高くなる。

そのため、初期治療薬の選択に際してはグラム染色などの迅速診断法を行い、可能であれば原因細菌を推定して、より狭域の抗菌薬を選択する。そのためには、グラム染色の所見の解釈ができるようにトレーニングする必要がある。また、広域抗菌薬の投与を始めるとしても、抗菌薬投与前に適切な検体を採取し、細菌学的な検査を行うことで、3日をめ

どに抗菌薬を狭域なものに de-escalation することが望ましい。

文 献

- 1) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会 編：成人院内肺炎診療の基本的考え方，2002
- 2) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会 編：成人院内肺炎診療ガイドライン，2008
- 3) 日本呼吸器学会医療・介護関連肺炎（NHCAP）診療ガイドライン作成委員会 編：医療・介護関連肺炎（NHCAP）診療ガイドライン，2011
- 4) American Thoracic Society ; Infectious Diseases Society of America : Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 171 : 388-416, 2005
- 5) Watanabe A, Yanagihara K, Kohno S et al. Multi-center survey on hospital-acquired pneumonia and the clinical efficacy of first-line antibiotics in japan. Intern Med 47 : 245-254, 2008

5 院内感染対策

DOs

- 糖尿病の患者は易感染性宿主であり、感染症が重症化しやすい。そのため、まず感染症を予防しよう。
- それぞれの感染症には特有の感染経路がある。どのような感染症かを知り、有効な感染経路を遮断しよう。

院内感染とは入院時には感染していなかった微生物によって、入院48～72時間以降に発症した感染症である。市中においても感染症は起こっているにもかかわらず、院内感染がなぜ問題になるのか、といえば、院内感染では抗菌薬の多剤に耐性の細菌や、結核、インフルエンザ、ノロウイルスなどの感染症が入院中の基礎疾患のある同一病棟の複数の患者に短い時間内に発生するため、院内感染と認識されやすいためである。病院側にはそれら感染症を迅速に制御(control)し、他の患者への感染を予防(prevent)する義務がある。したがって、院内感染として問題になるのは数名あるいは集団での発生であり、薬剤耐性菌が一例から分離されたからといって、即院内感染として問題になるわけではない。

院内感染対策の手段には、職員の健康管理、教育、感染対策相談(コンサルテーション)、発生動向監視(サーベイランス)、対策実施の適正化(レギュレーション)、および介入(インターベンション)がある。

院内感染対策をとるための具体的なプロセスは、感染症を発見することと、その感染症を封じ込めることである。感染症を発見することはサーベイランスであり、封じ込めることがインターベンションである。もちろん、特定の薬剤耐性菌が同定されてから対策を講じても手遅れであるから、そのような耐性菌が出現しても、院内に感染伝播しないように日頃から有効な院内感染

対策の遵守を習慣づけることも必要である。これが教育、コンサルテーションとレギュレーションである。また、この院内感染の中には、職員を職業上の感染症から守るということも含まれている。

1 院内感染対策実施の法的義務と病院内の組織

院内感染対策はすべての医療機関が行うべき医療法に定められている法的義務である。医療法第六条の10には、院内感染対策として「病院、診療所又は助産所の管理者は、厚生労働省令で定めるところにより、医療の安全を確保するための指針の策定、従業者に対する研修の実施その他の当該病院、診療所又は助産所における医療の安全を確保するための措置を講じなければならない¹⁾」と定められている。また、施設の院内感染対策の実施に関して、施設の管理者は院内感染対策に関する委員会を設置し、施設内の院内感染対策の推進を行う。院内感染の実施に関する委員会は通常「院内感染対策委員会(infection control committee: ICC)」と称される。ICCは、病院長、看護部、薬剤部門、検査部門、事務部門の責任者および感染症対策専門の医師等の職員から構成され、月1回程度開催され、院内感染対策に関する病院の方針や重要な決定がなされる。

2 感染症対策の実務を行うチーム(ICT)と感染防止対策加算

感染症対策の実際の実務を行うチームをインфекション・コントロール・チーム(ICT)と呼称する。ICTは、医師(歯科医師)、看護師、薬剤師、臨床検査技師、および事務職員などの病院の多職種によって構成され、特に前4つの職種には学会等による専門、認定制度が存在する。

院内感染対策にかかわる費用は、従来特別に措置されることはなかったが、近年は病院が診療報酬として得ることができるようになった。平成24年度の診療報酬改定において、大幅な増額があり、医師、看護師、薬剤師、臨床検査技師の4職種の職員が感染対策に専任で配属されている場合には、診療報酬上の感染防止対策加算がとれるようになった。この加算には加算1と加算2があり、加算1では、表1に示すように、部門を設置し、4職種の職員を専任とし(そのうち医師あるいは看護師のいずれかは専従)、加算2の施設とのカンファレンスなどを行うように定められている。加算2の施設には、すべて専任の職員で専従は必要なく、かつ看護師の適切な研修は義務づけられていない。

3 問題となる薬剤耐性菌と感染症法

感染症に関する法律には「感染症の予防

及び感染症の患者に対する医療に関する法律」いわゆる「感染症法」があり、届出等の規定が定められている(表2)。感染症法上で、基幹定点医療機関に報告が義務づけられている薬剤耐性菌は、MRSAと多剤耐性緑膿菌、バンコマイシン耐性腸球菌、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌、多剤耐性アシネトバクター感染症である。これらはいずれも感染症が発症したときに報告するものであり、保菌者の報告の義務はない。しかし、近年、重要な薬剤耐性菌が広がる可能性が指摘されており、カルバペネム耐性腸内細菌科が新たに届出感染症として加えられるべきことが検討されている(平成26年4月現在)。

このように感染症法における届出は、微生物の種類の変更や追加が行われていくため、経時的にチェックが必要である。

4 サーベイランス

日常的に実施しているサーベイランスには、薬剤耐性菌や法律上報告義務のある微生物感染症の検出・発症状況や、抗菌薬の使用状況などがある。感染症の発症状況は、他にも院内感染対策によって減少させることができる感染症、すなわち、カテーテル関連尿路感染症(UTI)、カテーテル関連血流感染症(BSI)、人工呼吸器関連肺炎(VAP)、術創部感染(SSI)などがある。サーベイランスによって、その施設の一定の

表1 感染防止対策加算1の条件

1. 専任の院内感染管理者が配置されており、感染防止に係る部門を設置していること。
2. 感染症対策に3年以上の経験を有する専任の常勤医師、5年以上感染管理に従事した経験を有し、感染管理に係る適切な研修を修了した専任の看護師(医師又は看護師のうち1名は専従)、3年以上の病院勤務経験をもつ感染防止対策にかかわる専任の薬剤師、3年以上の病院勤務経験をもつ専任の臨床検査技師からなる感染制御チームを組織し、感染防止に係る日常業務を行うこと。
3. 年4回程度、感染防止対策加算2を算定する医療機関と合同の感染防止対策に関する取組を話し合うカンファレンスを開催していること。
4. 感染防止対策加算2を算定する医療機関から必要時に院内感染対策に関する相談を受けていること。

表2 感染症法における医師の届出義務感染症 (平成26年4月現在)

- 1 類感染症(診断した医師は直ちに届出)
エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、痘そう、南米出血熱、ペスト、マールブルグ病、ラッサ熱
- 2 類感染症(診断した医師は直ちに届出)
急性灰白髄炎、結核、ジフテリア、重症急性呼吸器症候群(SARS コロナウイルスに限る)、鳥インフルエンザ H5N1
- 3 類感染症(診断した医師は直ちに届出)
コレラ、細菌性赤痢、腸管出血性大腸菌感染症、腸チフス、パラチフス
- 4 類感染症(診断した医師は直ちに届出)
E型肝炎、ウエストナイル熱、A型肝炎、エキノコックス症、黄熱、オウム病、オムスク出血熱、回帰熱、キャサナル森林熱、Q熱、狂犬病、コクシジオイデス症、サル痘、重症血小坂減少症候群(SFTS ウイルスに限る)、腎症候性出血熱、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、炭疽、チクングニア熱、つづが虫病、デング熱、東部ウマ脳炎、鳥インフルエンザ(H5N1 および H7N9 を除く)、ニパウイルス感染症、日本紅斑熱、日本脳炎、ハンタウイルス肺症候群、Bウイルス感染症、鼻疽、ブルセラ症、ペネズエラ脳炎、ヘンドラウイルス感染症、発疹チフス、ボツリヌス症、マラリア、野兔病、ライム病、リッサウイルス感染症、リフトバレー熱、類鼻疽、レジオネラ症、レプトスピラ症、ロッキー山紅斑熱
- 5 類全数(7日以内に届出、麻疹、風疹はできるだけ早く)
アメーバ赤痢、ウイルス性肝炎(A型及びB型を除く)、急性脳炎(ウエストナイル脳炎、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、東部ウマ脳炎、日本脳炎、ペネズエラ脳炎及びリフトバレー熱を除く)、クリプトスポリジウム症、クロイツフェルト・ヤコブ病、劇症型溶血性レンサ球菌感染症、後天性免疫不全症候群、侵襲性インフルエンザ菌感染症、侵襲性髄膜炎菌感染症、侵襲性肺炎球菌感染症、先天性風疹症候群、梅毒、破傷風、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症、バンコマイシン耐性腸球菌感染症、風疹、麻疹
- 指定感染症(診断した医師はただちに届出)
鳥インフルエンザ(H7N9)
- 5 類(小児科定点：週単位)
RSウイルス感染症、咽頭結膜熱、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎、感染性胃腸炎、水痘、手足口病、伝染性紅斑、突発性発疹、百日咳、ヘルパンギーナ、流行性耳下腺炎急性
- 5 類(インフルエンザ定点：週単位で届出)
インフルエンザ(鳥インフルエンザ及び新型インフルエンザを除く)
- 5 類(眼科定点：週単位で届出)
急性出血性結膜炎、流行性結膜炎
- 5 類(性病定点：月単位で届出)
性器クラミジア感染症、性器ヘルペス感染症、尖圭コンジローマ、淋菌感染症
- 5 類(基幹定点：週単位で届出)
感染性胃腸炎(ロタウイルスに限る)、クラミジア肺炎(オウム病を除く)、細菌性髄膜炎(髄膜炎菌、肺炎球菌、インフルエンザ菌を除く)、マイコプラズマ肺炎、無菌性髄膜炎
- 5 類(基幹定点：月単位で届出)
ペニシリン耐性肺炎球菌感染症、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症、薬剤耐性アシネトバクター感染症、薬剤耐性緑膿菌感染症

基準値以上に耐性菌が分離されていたり、感染症が発症しているような場合には、何らかの感染対策上の瑕疵が存在する可能性

を念頭に調査を開始する。薬剤耐性菌の増加の基準は、それぞれの耐性菌によって異なる。たとえば、MRSA などはその病棟

の直近の年間平均分離数と偏差値を算出し、平均 + 2SD より多い場合には調査・介入を行うなどである。一方、多剤耐性緑膿菌などは1例でも隔離などの介入を行い、同一病棟から2例検出された場合には、院内感染として徹底的な調査と対策を行う。

5 職員から患者への感染症予防のための対策

職員が感染症にかかり、病原体を院内で伝播することは、医療者として最も避けなければならないことである。そのため、患者と接する医療機関の職員は、入職時に必要なワクチンを接種すべきである。ワクチンによって予防可能な感染症で医療機関の職員が接種すべきワクチンとしては、B型肝炎ワクチン、季節性インフルエンザワクチン、流行性ウイルス感染症に対するワクチン(麻疹、風疹、水痘、流行性耳下腺炎)がある。これらの感染症のワクチンに対しては抗体価を測定の上、陰性者にはワクチン接種が禁忌の状態でない場合には積極的に接種すべきである。

結核も、職員からの感染として重要な感染症である。職員検診は必ず年1回受診し、胸部X線写真をチェックすべきである。また、かぜなどに罹患していないのに咳嗽、喀痰が2週間以上長引く場合には再度X線を撮るべきである。

また、職員は発熱、下痢、咳嗽、発疹などの症状のある場合には、勤務を休み、診断を受けてから勤務に復帰すべきであり、多忙を理由に勤務を続けることは、却って患者に感染を広げ、重大な結果をもたらすことを自覚すべきであろう。

6 患者から職員への職業上の感染の防止

医療環境において、職員が感染する機会には、針刺し切創事例の場合が最も深刻である。対象となる感染症は、B型、C型肝炎ウイルス、HIVである。報告例はほとんど

ないものの梅毒、成人T細胞白血病(ATL)ウイルスも考慮される場合もある。プリオンは、神経組織と接触した医療器材からの感染が考えられているが、針刺しでは感染しない。針刺しをした場合の感染率は、B型肝炎30%、C型肝炎3%、HIV0.3%程度である。これらのうち予防可能なものはB型肝炎とHIVである。B型肝炎については医療者は事前にワクチンを接種して抗体を獲得しておくべきである。もし、抗体が獲得できない、あるいはワクチンを接種していない場合には、B型肝炎抗原陽性者の血液に汚染された針などによる受傷、粘膜曝露が起こった場合には、抗HBsヒト免疫グロブリンの注射とワクチン接種を早急に開始することとなる。HIV陽性患者血液による曝露では、30分以内に抗HIV薬の内服が開始され、28日間内服を続けることで高率に感染予防ができるとされている。その他の感染症に関しては注意深く経過を観察することになる。これらの場合には、労働災害の申請を行うことが必要であり、必ず手続きを行っておく。

7 院内感染対策の実践

院内感染対策を実施するために必要な知識として標準予防策と感染経路別感染対策がある。基本的にはこの2つの考え方を組みあわせて、日常の感染対策を実践する。

a 標準予防策

標準予防策とは、すべての人の血液をはじめとする体液(分泌物、排せつ物、あるいは傷のある皮膚や粘膜)は感染性物質を含んだ危険なものであるとする考え方である。かつて非A非B型肝炎とよばれた肝炎ウイルスがC型肝炎ウイルスであると判明し検査が可能となったり、HIVが血液、体液を介して感染することが判明したりして、感染のリスクが認識されたという歴史がある。それまでは全く未知の感染症であり、予防の方法がわからなかった。そのような

歴史的事実から、判明している感染症の有無にかかわらず、すべての汗を除く血液や精液、便、尿などの体液にはいまだ解明されていない未知の感染物質、微生物が存在する可能性を考えて、対応すべきである。という考え方が標準予防策である。体液には素手で触れない、手袋を装着する。もし予期せずに触れた場合には、流水と石鹸による手洗いによって洗い落とすべきである。

b) 感染経路別感染対策 ……………

微生物は、感染するためには、標的となる臓器に付着しなければならない。そのために特有の感染経路を経由する必要がある。たとえば、結核菌は、肺胞内のマクロファージあるいは肺胞上皮細胞内に侵入し増殖することによって感染が成立する。くしゃみや咳のしぶきである飛沫では粒子径が大きいため上気道で捕捉され、肺胞領域に到達できない。飛沫の液性成分が乾燥し、 $5\mu\text{m}$ 以下の粒子径になったものが飛沫核であり、肺胞領域に到達する粒子径となる。インフルエンザウイルスは上気道の上皮細胞に付着して、細胞に侵入し、増殖を繰り返すため、飛沫で上気道に到達すれば感染が成立する。結核の感染には飛沫核になって浮遊する空気感染経路をとることが必要であり、空気感染対策には、通常のサージカルマスクではなく微粒子を除去するN-95マスクをフィットさせて装着することが必要である。

このように微生物が感染症を成立させるためには、感染する臓器にあわせた感染経路をとる必要があり、その感染経路を接触、飛沫、空気感染、および昆虫媒介感染経路として分類している。それぞれの感染経路に対する防御用具があり、たとえば先の空気感染対策にはN-95マスクが必要であるし、飛沫感染対策にはサージカルマスクで対応し、接触感染対策には手指衛生が有効となる。各種感染症の感染経路を表3に示す。麻疹などは、空気感染もするが、飛沫

表3 感染経路と感染症

接触感染する微生物
• 多剤耐性菌：
* メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)
* バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)
* ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)
* 多剤耐性緑膿菌(MDRP)
* 多剤耐性アシネトバクター(MDRab)
* カルバペネム耐性腸内細菌科(CRE)
• 腸管出血性大腸菌 O-157
• ロタウイルス
• ノロウイルス(空気感染もあり)
• EKC(流行性角結膜炎)
• ノルウェー疥癬 など
飛沫感染する微生物
• インフルエンザ(接触感染もあり)
• ムンプスウイルス
• 風疹ウイルス
空気感染する微生物
• 結核(空気感染しにくい)
• 麻疹(接触、飛沫感染もあり)
• 水痘

や接触でも感染伝播する。

空気感染する感染症に罹患した患者の隔離は、前室のある陰圧室にて行い、室内の空気が病棟内に漏出しないように管理すべきである。

8 外来における院内感染対策

院内感染は外来の待合室や見舞客によってもたらされる。代表的な院内感染はノロウイルス、インフルエンザ、結核、麻疹などである。これに対しては、病院の玄関にポスターを掲示して、発熱、発疹、下痢などの症状のある人にはマスクの着用や手洗い、あるいは見舞いの自粛を要請することが望ましい。外来を受診した患者で、咳嗽のある患者には他の患者とは空間的に分離できる場所で待機してもらい、他の患者との交差をさけて診察を行うように工夫することが望ましい。特に結核等の空気感染を疑う場合には、診察可能な陰圧室を外来

に設置することも必要である。また、咳の出る患者には咳エチケットを守ってもらうようにポスターなどで啓発することも必要である。咳エチケットとは、咳の出るときにはマスクを着用するか、口元をハンカチやティッシュペーパーで覆い、飛沫を飛ばさないように注意し、ティッシュペーパー等はすぐにゴミ箱に捨て、手洗いをを行うという一連の動作である。

9 抗菌薬の適正使用

糖尿病患者は易感染性宿主 (immunocompromised host) であり、外来において、あるいは入院中に感染症を併発することも多い。そのような場合、入院して抗菌薬の投与が始まり、その結果、もともと体内にいる薬剤耐性菌が体内で選択されたり、薬剤耐性菌が誘導されたり、あるいは外部から新たに院内感染として感染したりする。その結果、感染症を繰り返すたびに薬剤耐性菌が分離される頻度が高くなり、さらに広域の抗菌薬が選択され、難治感染症となってゆく傾向にある。入院中の糖尿病患者の院内感染のコントロールには、感染症発症時の適正抗菌薬の使用、院内感染対策の遵守による感染予防が他疾患の患者以上に重要である。

糖尿病患者は、肺炎、腎盂腎炎、蜂巣炎、壊死性筋膜炎、敗血症など細菌性の重篤な感染症を起こしやすく、いったん発症

すると重症化することがある。糖尿病患者の感染症は入院による治療が原則となるが、入院時のアセスメントとして、敗血症 (Sepsis) の病態か否かの鑑別を行う。特に敗血症性ショック、重症敗血症の場合には、集中治療が必要である。抗菌薬の選択は初期には広域の抗菌薬をエンピリックに選択し投与されるが、抗菌薬投与前に迅速に適切な検体を採取し、細菌学的な検査を行うことが最も重要である。可能であればグラム染色などを行い迅速に原因菌を推定し、抗菌薬を選択する根拠とすることが望ましい。また、3日後に細菌学的検査の結果を基に、臨床的な治療反応性も考慮し、抗菌薬をより狭域な標的治療に変更するように努めるべきである。そうすることが、次に起こるかもしれない感染症の治療をより選択肢の多いものに行うことができるからである。

10 糖尿病患者へのワクチンの接種

糖尿病患者には、ワクチンで予防可能な感染症に対しては積極的にワクチンを接種することが望ましい。現在糖尿病患者に推奨されているワクチンとしては、肺炎球菌ワクチンと季節性インフルエンザのワクチンがある。また、2009年の新型インフルエンザ A(H1N1) 流行時にも、糖尿病は重症化の危険因子のひとつとして、優先的なワクチン接種の対象となった。

DON'Ts

- 抗菌薬を使えば、体内に残った細菌は薬剤に耐性の細菌となる。その菌が次の感染症を起こすのだから、念のためとか安心のために不必要な抗菌薬を使ってはいけない。
- ICT は病院や病棟全体のサーベイランスを基に介入をするのであるから、ICT の介入には従うべきであり、自分の主張で診療をしてはいけない。

大阪大学医学部附属病院感染制御部 朝野和典

Research Article

Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model

Shigeto Hamaguchi,^{1,2} Yukihiro Akeda,² Norihisa Yamamoto,^{1,2} Masafumi Seki,¹
Kouji Yamamoto,³ Kazunori Oishi,^{2,4} and Kazunori Tomono¹

¹Division of Infection Control and Prevention, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan

²International Research Center for Infectious Diseases, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

³Department of Clinical Epidemiology and Biostatistics, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan

⁴Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

Correspondence should be addressed to Kazunori Tomono; tomono@hp-infect.med.osaka-u.ac.jp

Received 25 September 2014; Revised 2 January 2015; Accepted 20 January 2015

Academic Editor: Mashkoor A. Choudhry

Copyright © Shigeto Hamaguchi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Recently, it has been reported that circulating free DNA (cf-DNA) in the blood is increased in various infectious diseases, including sepsis. Moreover, a relationship between cf-DNA and neutrophil extracellular traps (NETs) has been suggested. However, it is still unclear what the source and physiological role of cf-DNA in sepsis are. In this study, we examined the source of cf-DNA by detecting citrullinated histone H3, a characteristic feature of NET formation, in cecal ligation and puncture- (CLP-)operated mice. In addition, neutrophil depletion using anti-Ly6G antibodies was performed to assess the association between neutrophils and cf-DNA. Increased cf-DNA levels were observed only in CLP mice and not in the control groups; the qPCR findings revealed that the cf-DNA was mainly host-derived, even in bacteremic conditions. Citrullinated histone H3 was not increased in the neutrophils upon CLP, and the depletion of neutrophils showed limited effects on decreasing the amount of cf-DNA. Taken together, these results suggested that elevated cf-DNA levels during early-phase sepsis may represent a candidate biomarker for the severity of sepsis and that, contrary to previous findings, cf-DNA is not derived from neutrophils or NETs.

1. Introduction

Sepsis is an emergency condition associated with significant mortality and excessive inflammation [1–5]. Sepsis caused by bacteremia arises from the host response to infection. Currently, the diagnosis of sepsis caused by bacteremia relies on culture-based pathogen detection and physiological criteria, including changes in the body temperature and heart/respiration rates. While these clinical diagnostic criteria are simple and clear, novel sepsis biomarkers that can lead to a more reliable early diagnosis and therapeutic decision-making are urgently needed. Until now, a number of molecules have been proposed as candidate sepsis biomarkers; however, there are currently few useful predictive biomarkers for the severity and prognosis of sepsis available in clinical practice [6].

Recently, it was reported that the circulating free DNA (cf-DNA) levels in the blood are increased in various infectious diseases, including sepsis [7, 8]. Accordingly, cf-DNA has been suggested as a potential predictive biomarker for several different conditions, including cancer and injury [9, 10]; moreover, one study of sepsis patients reported that greatly elevated plasma DNA and nucleosome levels (>800 ng/mL) were associated with a poorer outcome [7].

Furthermore, recent studies have reported that cf-DNA is associated with neutrophil extracellular traps (NETs) [7, 8, 10]. NETs were first reported as a novel innate immune mechanism of neutrophils in 2004 [11]. These are fibrous mesh-like structures that can rapidly trap and kill microbial pathogens [12]. In activated neutrophils, a mixture of chromosomal DNA and intracellular contents is extruded to the extracellular space as a fibrous structure upon a variety

of proinflammatory stimuli [13–15]. Moreover, citrullinated histone H3 has been reported as a characteristic molecule involved in NET formation *in vitro*, with citrullination of histone H3 by peptidylarginine deiminase 4 playing a pivotal role in chromatin decondensation during “NETosis” [15, 16]. In terms of the contribution of NETs to the host defense, it has been reported that depletion of NETs can lead to hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice [17]. Taken together, these previous findings suggest a potential relationship between cf-DNA and NETs in various aspects. However, it should be noted that most of the previous studies on cf-DNA were conducted using only human samples, and whether cf-DNA is indeed derived from NETs remains unclear.

In this study, using a mouse cecal ligation and puncture (CLP) sepsis model, we confirmed the elevation of the cf-DNA levels during sepsis and investigated whether the source of this cf-DNA was neutrophils, with particular focus on the NETs, or not.

2. Materials and Methods

2.1. Cecal Ligation and Puncture (CLP) Mouse Model. The CLP model for polymicrobial sepsis developed by Chaudry et al. [18] was established as previously described [19], with some modifications. In brief, 7–8-week-old C57BL/6J mice were used for the CLP operation; these were housed under specific pathogen-free conditions with free access to standard rodent food and water. We used five C57BL/6J mice per group for each experiment, except for the experiment shown in Figure 2(a), for which 13 mice in each group were used. Under general anesthesia, midline laparotomy was performed and the cecum was exposed and ligated distal to the ileocecal valve to prevent bowel obstruction, and the distal part of the cecum was punctured with a 22-gauge needle. A small amount of cecal content was manually extruded from the punctured cecum into the abdominal cavity. In all studies, after returning the cecum into the abdomen, 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) for fluid resuscitation was administered to create a more clinically relevant sepsis model as the standard care for human operations. The abdomen was closed using a single-layer technique. The sham mice were treated identically as the operated mice with the exception of the ligation and puncture of the gut. Under these conditions, all CLP mice showed signs of severe illness within 24 hours after the operation and high lethality after 48 hours. Further, treatment-naïve mice were included as additional controls for some experiments. All animal experiments were conducted in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee Guidelines of Osaka University.

2.2. Measurement of Plasma cf-DNA Amount. Whole blood was collected from each mouse by cardiac puncture under anesthesia and transferred into ethylenediaminetetraacetic acid-2Na tubes. The plasma was separated by centrifugation at 800 g for 10 minutes and immediately frozen at -80°C .

In order to explore the dynamics of cf-DNA under septic conditions, plasma was collected at 6 and 24 hours after the CLP operation from all mice, and the amount of cf-DNA in

the plasma at each time point was quantified directly using the Quant-iT PicoGreen dsDNA Quantification Reagent Kit (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) and a fluorescence microplate reader (SH-9000 Lab, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) according to the manufacturers' instructions. PicoGreen specifically binds dsDNA, and after excitation at 485 nm, the dsDNA/PicoGreen fluorescence complex can be detected at 538 nm [20].

2.3. Measurement of Plasma Interleukin-6 (IL-6). The plasma IL-6 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine mouse IL-6 immunoassay kit; R&D Systems, Wiesbaden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

2.4. Counting the Numbers of Bacteria. Bacteremia in the CLP mouse model was confirmed through analysis of whole blood immediately obtained by cardiac puncture. The local bacterial load in the CLP mice was determined by 10-fold serial dilution to a maximum of 10^8 . All samples were plated on sheep blood agar plates and incubated overnight at 37°C under aerobic conditions. The numbers of bacteria were determined by manual counting of the colonies on the plates.

2.5. Measurement of Bacterial/Host-Derived DNA. DNA was purified from the mouse plasma using the QIAamp Blood DNA Midi Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) in accordance with the manufacturer's instructions. To quantify the estimated amount of DNA in the plasma, 16S rDNA and mouse β -2-microglobulin (B2M) were selected as representative targets of bacterial DNA and mouse-derived DNA, respectively, and TaqMan quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay of the purified DNA was subsequently performed using an ABI 7900HT real-time PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Amplification of each target was performed using the KAPA SYBR fast qPCR kit (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA) with the following primers: 16S-forward primer (1055f: $5'$ -ATGGCT-GTCGTCAGCT- $3'$), 16S-reverse primer (1392r: $5'$ -ACG-GGCGGTGTGTAC- $3'$), B2M-forward primer (B2M exon4-F; $5'$ -CTTTTGGTAAAGCAAAGAGGCC- $3'$), and B2M-reverse primer (B2M exon4-R; $5'$ -TTGGGGGTGAGAATT-GCTAAG- $3'$) [21]. The reaction mixture ($8\ \mu\text{L}$) contained $5\ \mu\text{L}$ of KAPA SYBR qPCR Master Mix, $0.2\ \mu\text{L}$ of distilled water, $0.4\ \mu\text{L}$ of each $5\ \mu\text{M}$ primer, and $2\ \mu\text{L}$ of sample DNA. PCR was performed at 95°C for 60 seconds, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 60 seconds, and final extension at 72°C for 15 seconds. The results were analyzed using SDS 2.3 software (Applied Biosystems). A standard curve was determined based on the concentration gradient of the purified DNA from mouse whole blood for mice B2M and the purified DNA from *Streptococcus pneumoniae* for 16S rDNA.

2.6. Blood Cell Counting and Isolation of Neutrophils from Mice. For each mouse, $20\ \mu\text{L}$ of blood was analyzed to count the number of white blood cells (WBCs) using the Celltac hematology analyzer (MEK-6308; Nihon Kohden, Tokyo, Japan).

For neutrophil isolation, blood was collected from each mouse followed by separation with centrifugation for 20 minutes at 800 g using Histopaque-1119 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The neutrophil-rich phase was collected, washed in PBS, and separated by discontinuous density-gradient centrifugation in Percoll (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), as previously described [22]. Subsequently, the neutrophils were collected from the 70–75% layer of the Percoll gradient and washed with PBS; after hypotonic lysis with 0.2% and 1.6% NaCl solutions to remove residual erythrocytes, the cells were resuspended in RPMI-1640 (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Purity and viability were routinely assessed using Diff-Quik stain (Sysmex, Kobe, Japan) and trypan blue stain (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), respectively, under a microscope.

2.7. Detection of Citrullinated Histone H3 as a NET Marker. For flow cytometric analyses, isolated neutrophils were fixed in 2% paraformaldehyde for 5 minutes and washed three times in PBS with 3% fetal bovine serum (FBS). Intracellular citrullinated histone H3 staining was carried out as follows: fixed neutrophils were incubated (10^6 cells/mL) in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) with 1% FBS for 30 minutes in the presence of 0.5% saponin. After washing with PBS, the cells were incubated with Alexa488-conjugated rabbit citrullinated histone H3 antibody (ab5103; Abcam, Cambridge, UK) using the Alexa Fluor 488 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Invitrogen) or isotype control antibody (sc-45068; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) for 20 minutes and then washed in PBS with 3% FBS. The cells were analyzed using fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur with CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

For western blotting, cell lysates of Percoll gradient-purified neutrophils were subjected to SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane blocked with Can Get Signal blocking buffer (TOYOBO, Osaka, Japan) and incubated with goat polyclonal anti-histone H3 antibody (ab5103, Abcam; 1:1000 in tris-buffered saline-Tween 20 [TBST]) or rabbit polyclonal anti-citrullinated histone H3 antibody (ab12079; Abcam; 1:1000 in TBST) for 1 hour at room temperature. The proteins were detected upon incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-goat or anti-rabbit IgG (1:10,000) for 15 minutes using ECL Western Blotting Reagent (GE Healthcare).

2.8. Neutrophil Depletion In Vivo. Ly6G-specific monoclonal antibody was used to specifically deplete neutrophils in the mice [23]. The mice were intraperitoneally injected with 1 mg of isotype control rat IgG or rat monoclonal anti-Ly6G antibody (1A8; BioXCell, Lebanon, NH, USA) 2 days before and on the day of CLP operation. After neutrophil depletion, the mice were operated for CLP or sham operation. Subsequently, the mice were sacrificed and the whole blood and intraperitoneal wash from each mouse were subjected to cell counting at 6 and 24 hours after the operation. Neutrophil depletion was confirmed by morphology using Diff-Quik stain and by cell counts using the Celltac hematology analyzer.

2.9. Statistical Analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 5.02; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All data are presented as mean \pm standard deviation. Data obtained from multiple groups were tested using the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by post hoc Dunn's multiple comparison tests. Data were considered to be statistically significant at $P < 0.05$. In the Figures 1, 2, and 4, statistical significance is indicated by asterisks.

3. Results

3.1. Establishment of Septic Condition in CLP Mice. For each experiment, CLP or sham operation was performed in five C57BL/6J mice each, and blood samples were collected at 6 and 24 hours after the operation. In the CLP mice, the plasma IL-6 levels were found to be increased 6 and 24 hours after CLP. In contrast, plasma obtained from the sham-operated mice and naïve mice contained extremely low levels of IL-6 (Figure 1(a)). Likewise, no local bacterial load was detected from any of the blood cultures from these mice. On the other hand, for the CLP mice, 2 out of 5 blood cultures were positive at 6 hours, and these contained approximately 1×10^2 CFU/mL; at 24 hours, all samples (5/5) were positive for bacterial growth (approximately 1×10^5 CFU/mL; Figure 1(b)). These results confirmed that CLP mice at 6 and 24 hours after CLP operation are under septic conditions [17] and can be used as a septic model for further analyses.

3.2. Dynamics of cf-DNA under Septic Conditions in CLP Mice. The amount of cf-DNA gradually increased at 6 hours after the CLP operation and peaked at 24 hours. In contrast, the cf-DNA levels were not elevated in the sham-operated mice and naïve mice (Figure 2(a)). Significant differences between the CLP and sham groups were observed at each time point. As the elevation of the cf-DNA amount may have been caused by bacteremia, the origin of the cf-DNA was determined by qPCR of the plasma cf-DNA using organism-specific primers (mouse B2M and bacterial 16S rDNA) [24]. The amount of 16S rDNA was slightly increased in the plasma from the CLP group at 6 hours after CLP (Figure 2(b)), whereas the amount of B2M was significantly increased in the plasma from the CLP group at 6 and 24 hours after CLP (Figure 2(c)). Similar increments in the amount of B2M were observed in each CLP group, with the amount of 16S rDNA being only approximately 1% of that of mouse B2M at each time point. These results suggested that, even under septic conditions, the cf-DNA was mainly derived from the host cells.

3.3. Association between Neutrophils and Serum cf-DNA Elevation under Septic Conditions. It has been proposed that neutrophils contribute to the elevation of cf-DNA in the blood; however, it has not been demonstrated whether neutrophils, or more precisely NETs, correlate with increased cf-DNA levels under septic conditions. Recently, it was reported that citrullinated histone H3 represents a likely hallmark of NET formation via peptidylarginine deiminase 4. To test this hypothesis, whole blood was collected from the CLP mice, and the neutrophils were isolated and subjected to western blotting and FACS analysis using anti-citrullinated histone

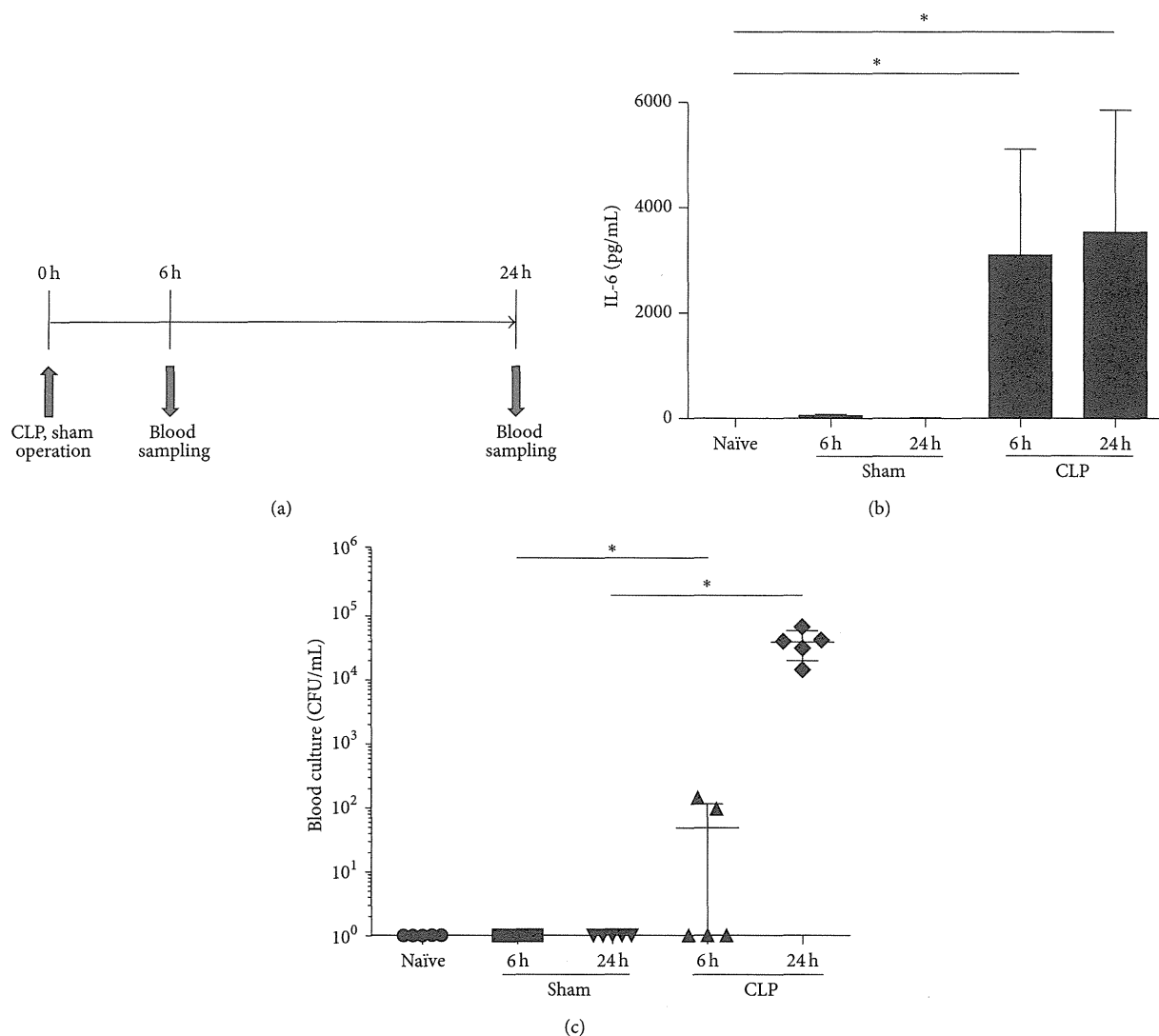


FIGURE 1: Establishment of sepsis in the cecal ligation and puncture (CLP) mice. (a) Plasma levels of interleukin-6 (IL-6) at 6 and 24 hours after CLP or sham operation. (b) Bacterial counts of the blood culture at 6 and 24 hours after CLP or sham operation. Five mice from each group were used for each experiment. The error bars represent the mean \pm standard deviation; * $P < 0.05$.

H3 as a NET marker. Compared with the neutrophils of naïve mice, minimal differences in terms of the size of the anti-citrullinated histone H3 antibody bands were observed upon western blotting (Figure 3(a)). Similarly, FACS analysis also revealed no shifts of the fluorescent peaks of citrullinated histone H3 between sham-operated and CLP mice as compared with naïve mice (Figure 3(b)).

3.4. Dynamics of *cf*-DNA in Neutrophil-Depleted Mice. To assess the involvement of neutrophils, the neutrophils were depleted by injection of anti-Ly6G antibodies [23]. When the anti-Ly6G antibody was injected to the sham-operated group, their WBC numbers in the blood decreased, with less than 2% neutrophils observed in the WBC at 6 and 24 hours by Diff-Quik stain of the blood smear, confirming

successful depletion of neutrophils. Using the same protocol of neutrophil depletion, the neutrophil-depleted CLP-operated mice showed significantly lower numbers of WBCs in the blood than those of the sham-operated mice. However, the CLP-operated group treated with the control antibody showed similar low numbers of WBCs in the blood, which may have resulted from the consumption of the WBCs in the circulation at inflammation sites under septic condition (Figure 4(a)). On the other hand, the WBC counts in the ascites from the CLP-operated group with neutrophil depletion showed lower cell counts than those of the CLP-operated group treated with the control antibody (Figure 4(b)). Along with the WBC counts, the bacterial load was also examined and indicated that neutrophil depletion had no effect on the bacterial load in the blood and ascites with versus without

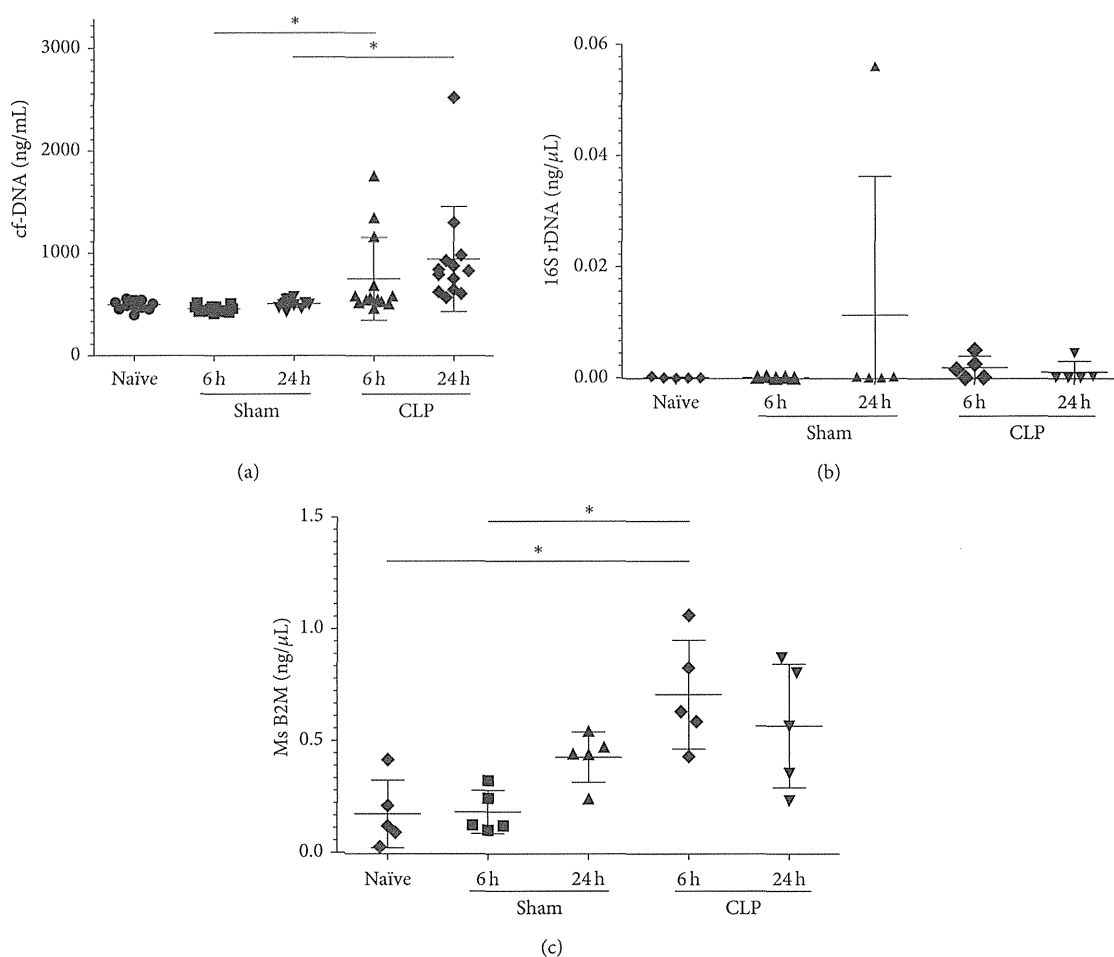


FIGURE 2: Dynamics of circulating free (cf) DNA and quantification of host-derived and bacteria-derived cf-DNA. (a) Amount of cf-DNA in the plasma at 6 and 24 hours after cecal ligation and puncture (CLP) or sham operation ($n = 13$ mice per group). (b) Amount of bacteria-derived DNA, quantified based on 16s rDNA by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) ($n = 5$ mice per group). (c) Amount of host-derived DNA, quantified based on mouse beta-2-microglobulin by quantitative real-time PCR ($n = 5$ mice per group).

neutrophils (Figures 4(c) and 4(d)). Finally, the amount of cf-DNA in each group was measured and revealed that the neutrophil depletion did not affect the amount of cf-DNA in the blood under septic conditions (Figure 4(e)). Taken together, these results suggested that the increasing levels of cf-DNA in the blood under septic conditions were derived from host cells other than neutrophils, which have been reported as a likely source of cf-DNA by NET formation.

4. Discussion

The presence of abnormally high levels of cf-DNA in the plasma of patients with malignant diseases was first described in the 1970s [18]. However, it is only recently that cf-DNA has attracted attention in terms of its potential use as a diagnostic or prognostic marker [6, 9].

In this study, *in vivo* experiments using a CLP mouse model of sepsis showed that the cf-DNA levels increased

in a time-dependent manner after the onset of sepsis (Figure 2(a)). This finding confirmed the conclusion of previous clinical studies reporting that cf-DNA correlated with the severity of the clinical outcome of sepsis [7, 8]. cf-DNA is found in many pathophysiological conditions, including infection and cancer [7, 9, 25–27]. These conditions generally involve apoptosis and/or necrosis; therefore, it is reasonable to consider apoptosis and necrosis as sources for the presence of cf-DNA [28]. To date, cf-DNA has been evaluated primarily as a biomarker of septic condition, whereas the potential function of cf-DNA has not been investigated in detail. Our results indicate that the sepsis model used in this study, the CLP mouse model, is sufficient as an evaluation model for cf-DNA.

As another important result, we found that the increase in cf-DNA in CLP mice contained mostly host cf-DNA and only negligibly amounts of bacterial DNA. This finding suggests that the cf-DNA was mainly derived from the host

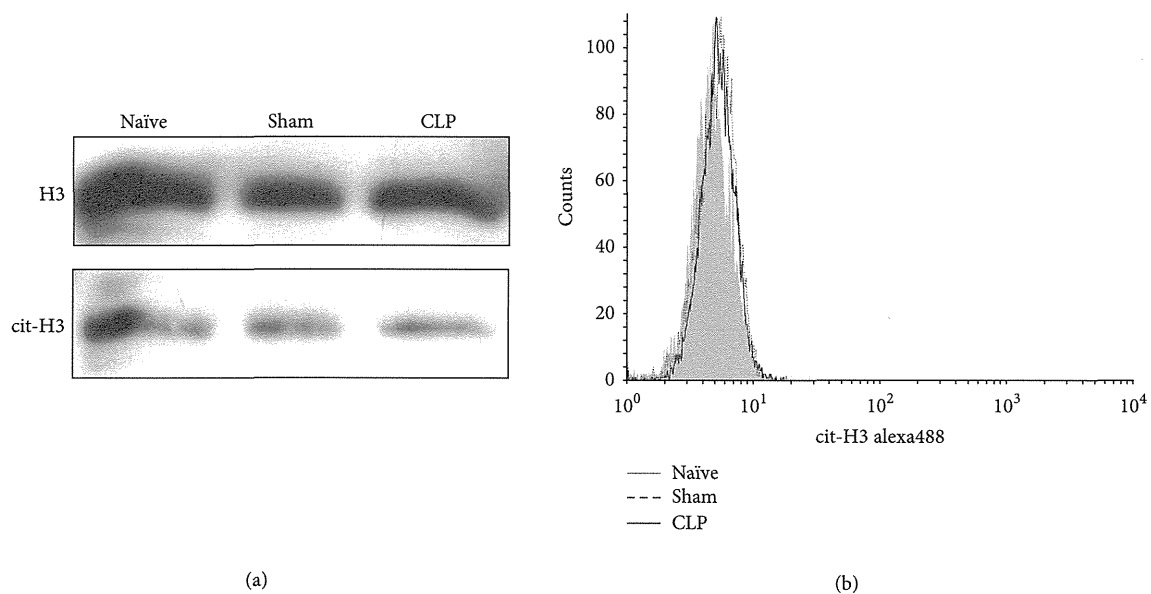


FIGURE 3: Involvement of citrullinated histone H3 in sepsis. (a) Western blot analysis of histone H3 and citrullinated histone H3 after cecal ligation and puncture (CLP) or sham operation. (b) Flow cytometric analysis of citrullinated histone H3 after CLP or sham operation. The samples were collected from a single mouse from each group, and the experiments were repeated at least three times.

cells even under septic/bacteremic conditions. Further, our study investigated whether NET formation occurred during sepsis in our model, using citrullination of histone H3, a known NET marker. Interestingly, two independent experiments (western blotting and FACS analysis) showed that citrullinated histone H3 was barely increased under septic conditions. As mentioned, citrullinated histone H3 has been reported as a characteristic feature of NET formation and has been specifically implicated in the decondensation of the nucleus [16, 29]. Therefore, our results suggested that, under septic conditions, the increase of cf-DNA might not be derived from the NETs produced by neutrophils, but rather from other types of host cells. Although the relationship between citrullinated histone H3 and NET formation was recently demonstrated *in vitro*, it has been suggested that the presence of citrullinated histone H3 is not an ultimate prerequisite for the formation of NETs within individual neutrophils and the absence of an increase in the amount of citrullinated histone H3 in neutrophils observed in the present study implies a lack of involvement of NETs in cf-DNA production under *in vivo* septic conditions. Although we originally hypothesized that neutrophils were the main source of cf-DNA, as the citrullination of histone did not increase even under septic conditions, this hypothesis was refuted. Additionally, our hypothesis was also refuted by the results of the neutrophil depletion. Previously, our group observed the presence of NETs in circulating blood under systemic inflammatory response syndrome conditions, including sepsis, using fluorescent immunohistochemical analysis of blood smears [30], and several other studies have reported similar findings, hence suggesting a potential relationship between NETs and cf-DNA [7, 8, 10, 17]. Therefore, the results

acquired in the present study were surprising for us, as we expected that the cf-DNA would comprise mainly NET-derived DNA. The exact mechanism of cf-DNA production in the blood is still not understood; although our experiments did not reveal the cells of cf-DNA origin, our findings do indicate that NETs do not participate in the production of cf-DNA, at least not under severe bacteremic conditions. This discrepancy in terms of the source of cf-DNA will need to be examined and confirmed by further experiments in the future.

Nonetheless, we speculate that a potential source of cf-DNA might be necrotic tissue or apoptotic cells at the infection site, or, more specifically, endothelial cells. In fact, a relationship between cf-DNA and plasma levels of typical cellular apoptotic markers has been described in lung cancer patients [31]. Moreover, an association between NET-related endothelial damage and platelets has also been described [32].

To study the innate immune mechanisms, host-derived and bacterial DNA must be distinguished. In addition to citrullinated histone H3 used in this study, other mechanisms to accurately recognize host DNA, including NETs, such as detection of specific proteins like Toll-like receptor-9 or detection of ds-DNA or the CpG motif, may prove useful in future experiments. In innate immune mechanism, it is strictly controlled to distinguish between host-derived DNA and bacterial DNA. It would be possible to find out another unknown mechanism to recognize host DNA including NETs by specific protein such as cit-H3, besides Toll-like receptor-9 to detect ds-DNA of CpG motif.

From our results and those of the previous reports on the topic, we believe that cf-DNA shows potential as a noninvasive, useful biomarker of sepsis and bacteremia.

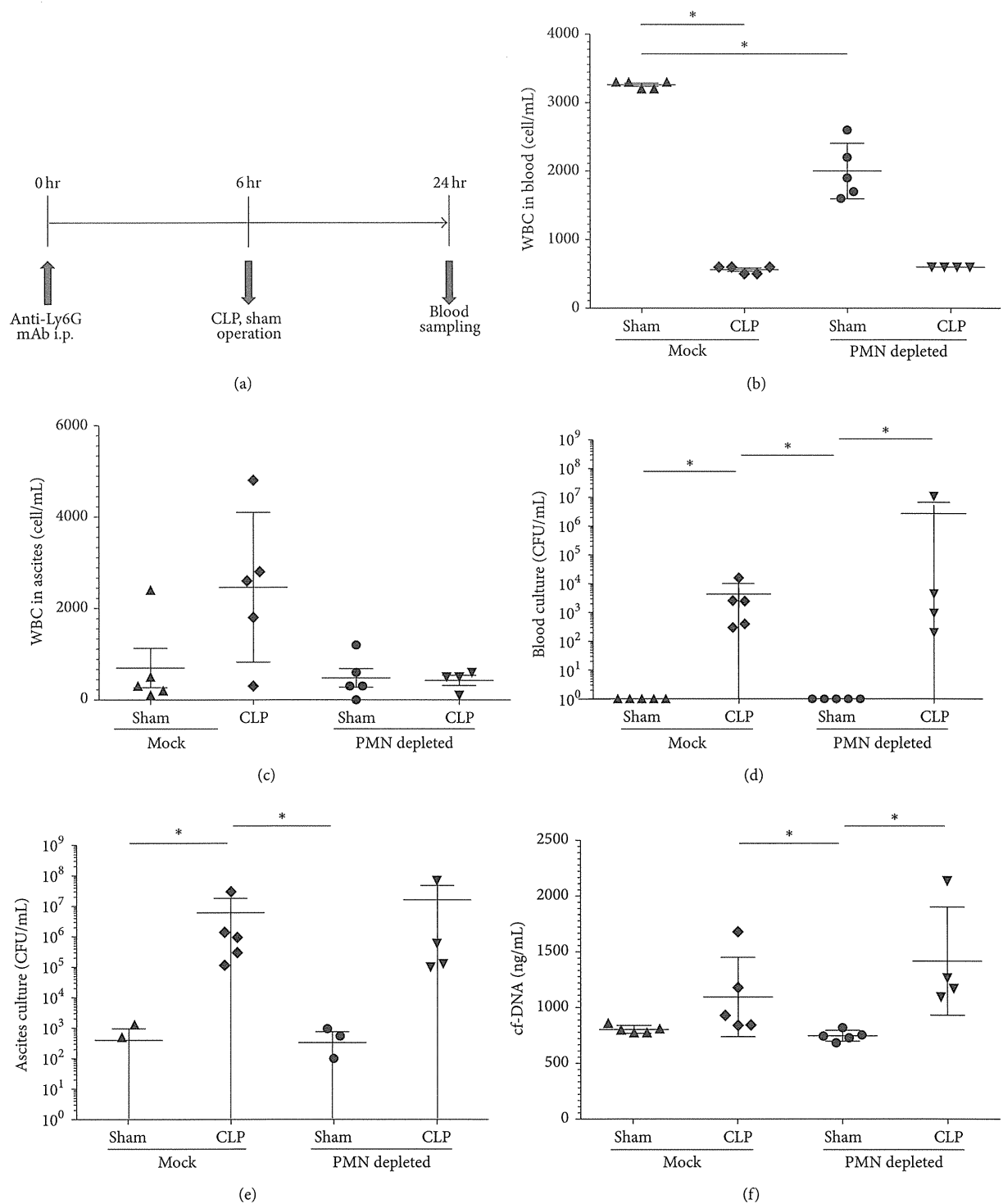


FIGURE 4: Effect of neutrophil depletion on circulating free (cf) DNA. (a), (b) White blood cell number in (a) the blood and (b) ascites at 24 hours after the operation, with or without neutrophil depletion. (c), (d) Bacterial count of (c) the blood and (d) ascites cultures at 24 hours after the operation, with or without neutrophil depletion. (e) Amount of cf-DNA in the plasma at 24 hours after cecal ligation and puncture (CLP) or sham operation, with or without neutrophil depletion. Five mice from each group were used for each experiment.

However, the significance of cf-DNA under sepsis has not yet been fully investigated. Our experiments indicated that the CLP mouse model is a promising model for studying the significance of cf-DNA. In the future, using this model along with different animal models of sepsis, the mechanism of cf-DNA production should be clarified to confirm the utility of cf-DNA as a biomarker for sepsis, and clinical research on the relationship between cf-DNA and clinical manifestations should be performed.

5. Conclusion

In conclusion, our study using CLP mice revealed that the cf-DNA levels were elevated in the early phase of septic condition, implying a potential of cf-DNA to reflect the severity of sepsis and indicating its usefulness as a biomarker for the early detection of septic conditions. Unexpectedly, under septic conditions, it was moreover observed that cf-DNA was not derived from NETs produced by neutrophils, but mainly from host cells other than neutrophils. We hypothesize that the main source of cf-DNA might be dead tissue particles, such as necrotic cells. This may change the pathophysiological concept of cf-DNA formation during sepsis, at least in part, and further studies are needed to confirm this hypothesis.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no financial or nonfinancial competing interests.

References

- [1] M. M. Levy, A. Artigas, G. S. Phillips et al., "Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 12, no. 12, pp. 919–924, 2012.
- [2] B. D. Winters, M. Eberlein, J. Leung, D. M. Needham, P. J. Pronovost, and J. E. Sevransky, "Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review," *Critical Care Medicine*, vol. 38, no. 5, pp. 1276–1283, 2010.
- [3] T. M. Perl, L. Dvorak, T. Hwang, and R. P. Wenzel, "Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis," *Journal of the American Medical Association*, vol. 274, no. 4, pp. 338–345, 1995.
- [4] R. P. Dellinger, M. M. Levy, J. M. Carlet et al., "Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008," *Critical Care Medicine*, vol. 36, no. 1, pp. 296–327, 2008.
- [5] T. van der Poll and S. M. Opal, "Host-pathogen interactions in sepsis," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 8, no. 1, pp. 32–43, 2008.
- [6] K. Reinhart, M. Bauer, N. C. Riedemann, and C. S. Hartog, "New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, no. 4, pp. 609–634, 2012.
- [7] S. Margraf, T. Lögters, J. Reipen, J. Altrichter, M. Scholz, and J. Windolf, "Neutrophil-derived circulating free DNA (CF-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis," *Shock*, vol. 30, no. 4, pp. 352–358, 2008.
- [8] T. Lögters, A. Paunel-Görgülü, C. Zilkens et al., "Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 27, no. 11, pp. 1401–1407, 2009.
- [9] V. Swarup and M. R. Rajeswari, "Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases," *FEBS Letters*, vol. 581, no. 5, pp. 795–799, 2007.
- [10] J. Altrichter, S. Zedler, R. Kraft et al., "Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs), a potential prognostic marker for mortality in patients with severe burn injury," *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, vol. 36, no. 6, pp. 551–557, 2010.
- [11] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann et al., "Neutrophil extracellular traps kill bacteria," *Science*, vol. 303, no. 5663, pp. 1532–1535, 2004.
- [12] T. Lögters, S. Margraf, J. Altrichter et al., "The clinical value of neutrophil extracellular traps," *Medical Microbiology and Immunology*, vol. 198, no. 4, pp. 211–219, 2009.
- [13] C. F. Urban, U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky, "Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms," *Cellular Microbiology*, vol. 8, no. 4, pp. 668–676, 2006.
- [14] T. A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann et al., "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps," *Journal of Cell Biology*, vol. 176, no. 2, pp. 231–241, 2007.
- [15] Q. Remijsen, T. W. Kuijpers, E. Wirawan, S. Lippens, P. Vandabeele, and T. V. Berghe, "Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality," *Cell Death and Differentiation*, vol. 18, no. 4, pp. 581–588, 2011.
- [16] I. Neeli, S. N. Khan, and M. Radic, "Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils," *The Journal of Immunology*, vol. 180, no. 3, pp. 1895–1902, 2008.
- [17] W. Meng, A. Paunel-Görgülü, S. Flohé et al., "Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice," *Critical Care*, vol. 16, no. 4, article R137, 2012.
- [18] I. H. Chaudry, K. A. Wichterman, and A. E. Baue, "Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels," *Surgery*, vol. 85, no. 2, pp. 205–211, 1979.
- [19] J. T. Muenzer, C. G. Davis, B. S. Dunne, J. Unsinger, W. M. Dunne, and R. S. Hotchkiss, "Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant 'two-hit' model of sepsis," *Shock*, vol. 26, no. 6, pp. 565–570, 2006.
- [20] X. Y. Xue, M. D. Teare, I. Holen, Y. M. Zhu, and P. J. Woll, "Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum," *Clinica Chimica Acta*, vol. 404, no. 2, pp. 100–104, 2009.
- [21] G. Harms, A. C. Layton, H. M. Dionisi et al., "Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant," *Environmental Science and Technology*, vol. 37, no. 2, pp. 343–351, 2003.
- [22] V. Brinkmann, B. Laube, U. Abu Abed, C. Goosmann, and A. Zychlinsky, "Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them," *Journal of Visualized Experiments*, no. 36, Article ID e1724, 2010.
- [23] J. M. Daley, A. A. Thomay, M. D. Connolly, J. S. Reichner, and J. E. Albina, "Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 83, no. 1, pp. 64–70, 2008.

- [24] P. C. Y. Woo, S. K. P. Lau, J. L. L. Teng, H. Tse, and K.-Y. Yuen, "Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14, no. 10, pp. 908–934, 2008.
- [25] G. Sozzi, D. Conte, M. Leon et al., "Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 21, no. 21, pp. 3902–3908, 2003.
- [26] A. A. Kamat, F. Z. Bischoff, D. Dang et al., "Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma," *Cancer Biology & Therapy*, vol. 5, no. 10, pp. 1369–1374, 2006.
- [27] S. Breitbach, S. Tug, and P. Simon, "Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology," *Sports Medicine*, vol. 42, no. 7, pp. 565–586, 2012.
- [28] K. Jung, M. Fleischhacker, and A. Rabiën, "Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature," *Clinica Chimica Acta*, vol. 411, no. 21–22, pp. 1611–1624, 2010.
- [29] Y. Wang, M. Li, S. Stadler et al., "Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation," *Journal of Cell Biology*, vol. 184, no. 2, pp. 205–213, 2009.
- [30] S. Hamaguchi, T. Hirose, Y. Akeda et al., "Identification of neutrophil extracellular traps in the blood of patients with systemic inflammatory response syndrome," *Journal of International Medical Research*, vol. 41, no. 1, pp. 162–168, 2013.
- [31] G. J. Fournié, J.-P. Courtin, F. Laval et al., "Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours," *Cancer Letters*, vol. 91, no. 2, pp. 221–227, 1995.
- [32] S. R. Clark, A. C. Ma, S. A. Tavener et al., "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 4, pp. 463–469, 2007.